



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09157295 A**(43) Date of publication of application: **17.06.97**

(51) Int. Cl.

C07K 14/705
C07H 21/04
C12N 15/09
C12P 21/02
// A61K 31/70
A61K 38/00
A61K 38/00
(C12N 15/09 , C12R 1:91), (C12P 21/02
, C12R 1:19)

(21) Application number: **07344504**(22) Date of filing: **05.12.95**(71) Applicant: **KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN**(72) Inventor: **SEYA TSUKASA**
MATSUMOTO MISAKO**(54) MEMBRANOUS PROTEIN M161AG AND CYCLIC-DNA CAPABLE OF CODING THE SAME****(57) Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new membranous protein M161Ag, having a specific amino acid sequence, biosynthetically produced in relation to apoptosis of a cell, having actions on promotion of the clearance of a human myelocytic leuke mic cell and useful as a therapeutic agent, etc., for leukemia, etc.

SOLUTION: This new membranous protein M161Ag has an amino acid sequence represented by the formula or an amino acid sequence substantially the same as that of the amino acid sequence represented by the formula and is biosynthetically produced in relation to the apoptosis of a cell, capable of promoting the clearance of a cancer cell, especially a human myelocytic leukemic cell and useful as a therapeutic agent, etc., for leukemia, etc. The membranous protein M161Ag is obtained by extracting an mRNA from a P39 (+) strain which is a substrain of a myelocytic leukemic cell strain P39, preparing a cDNA library using the resultant mRNA, then screening the prepared cDNA library with a synthetic oligonucleotide capable of coding a part of an amino acid sequence of the membranous protein purified from the P39 (+) strain as a probe, integrating the resultant cDNA into a vector and carrying out the expression thereof in a host cell.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

1	13	21	33	41	51
SEKSKKELLG	LSMAATLPA	VAYSDNNDS	SNSEFEKDK	SKYTTNANG	EQVVCNABLL
81	91	81	91	101	111
ELKPVLTGS	GRNDKRPNO	SAPALKKAT	KZTGEPNV	KPSNPFESAY	NEALLAGHKL
121	131	141	151	161	171
PLNDRNRQQ	SEKQYIDAH	RELERNQKI	KSDNDSTG	YKPYELQPN	DEBAPPTUY
181	191	201	211	221	231
ALASPLERQD	RSRNVVLSFG	CGAPPOVITP	NROFAKORLY	YHQRKLSKKI	YHTSPVIELIS
241	251	261	271	281	291
QPTACREHMT	VDRVVLSTP	ADYKYNPFV	LSVACFATRE	TURLANQOQY	VIGVDSQDCK
301	311	321	331	341	351
TQEDREITS	VLSKNSQAVY	STLLRLERK	SEGVDPVYVE	DEKADKSH	POTQETKMG
361	371	381	391	401	411
YAKNFRNTE	DQAKNKKK	BAIDMPFELP	EDPVKTRSD	KALKEDNKED	MYSDLELAK
421					
SADKAAK**					

* : アミノ酸
 ** : 終止

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-157295

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 14/705			C 0 7 K 14/705	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			A 6 1 K 31/70	
// A 6 1 K 31/70		9282-4B	C 1 2 N 15/00	ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-344504

(22) 出願日 平成7年(1995)12月5日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 瀬谷 司

奈良県奈良市鶴舞西町2丁目10, E-106

(72) 発明者 松本 美佐子

奈良県生駒市北大和2丁目20-7

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

(54) 【発明の名称】 膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNA

(57) 【要約】

【解決手段】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Ag、及び前記アミノ酸配列をコードするcDNA。

【効果】 新規な膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNAを提供する。

PTO 2002-3859

S.T.I.C. Translations Branch

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Ag。

【請求項2】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードするcDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なタンパク質 M161Ag及び当該タンパク質をコードするcDNA 10 に関する。

【0002】

【従来の技術】 M161Agは、ヒト骨髄性白血病細胞株P39(+)に含まれる膜タンパク質であり、第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクローナル抗体の作成はすでになされている(Matsumoto et al., J. Exp. Med., 181, 115-125(1995))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、様々な生理活性を有する膜タンパク質M161AgをコードするcDNAを単離し、該タンパク質のより効率的な利用手段を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、M161AgのN末端アミノ酸配列よりプローブを決定し、これを用いてP39のcDNAライブラリーから陽性クローンを単離することに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明は、図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Agである。

【0005】 また、本発明は、図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードするcDNAである。以下、本発明を詳細に説明する。本発明のcDNAは、以下のようにしてクローニングすることができる。まず、精製されたM161Agのアミノ酸配列より、プローブを作成する。M161Agは骨髄性白血病細胞株P39の亜株であるP39(+)より、前記したJ. Exp. Med., 181, 115-125(1995)記載の方法に従って、単離精製することができる。P39は、ジャパニース・キャンサー・リサーチ・リソース・バンクが保管している。P39(+)亜株は、親株のP39(+)を低温(12℃)下、48時間培養し、アポトーシス耐性を獲得した株の中から得られる。

【0006】 次に、P39より、全mRNAを抽出し、これからcDNAを合成する。合成したcDNAを適当なベクターに挿入し、宿主となる微生物を形質転換し、cDNAライブラリーを作成する。P39(+)より、mRNAを抽出する方法は、市販のInvitrogen mRNA 抽 50

出キットにより行うことができる。cDNAのクローニングは、例えば、pCEV4ベクターの組み込まれたP39(+)細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。ベクターとしては、他にpBluescriptなどを用いることができる。形質転換する微生物としては、例えば、大腸菌株、MC1803などを用いることができる。スクリーニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行うことができる。

【0007】 クローニングされたcDNAの大きさは、約1.3kbであり、その塩基配列は図2及び図3に示す通りである。これから推定されるアミノ酸配列、即ち、M161Agのアミノ酸配列は、図1に示す通りである。図1に示すようにこのタンパク質の24個のシグナルペプチドを含む428個のアミノ酸からなり、推定分子量は42kDaである。

【0008】 本発明の対象となるタンパク質のアミノ酸配列は、図1に示す配列に限定されず、これと実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明の技術的範囲に含まれる。ここで、「実質的に同一」とは、図1に示すアミノ酸配列の幾つかのアミノ酸残基について、欠失、置換、付加等の変化が生じた配列であって、前記配列と同様に第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着など機能を有するような配列をも含むという意味である。同様に本発明のcDNAの塩基配列も、図1に示すアミノ酸配列をコードするものに限定されず、これと実質的に同一な塩基配列を有するDNAも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0009】 M161Agは、細胞のアポトーシスに関連して生合成される膜タンパク質であり、癌細胞、特にヒト骨髄性白血病細胞のクリアランスを促進する。従って、M161Ag及びそれをコードするcDNAは、白血病などの治療薬として利用することができる。

【0010】

【発明の実施の態様】

【0011】

【実施例】

【実施例1】 cDNAのクローニング

＜プローブの作成＞M161Agを抗体(M161Ab, 文献J. Exp. Med., 181, 115-125(1995)参照)をプローブとしてP39(+)株3×10¹⁰個の細胞可溶化画分より精製(精製法、上記文献)し、約50μgの精製蛋白質を得た。本標品をアミノ末端分析機(ABI ペプチドシーケンサー)にかけ、以下のN末端アミノ酸配列を得た。

【0012】 XGNNDEsNI sFkDI s gY

(大文字は確定したアミノ酸を示し、小文字は可能性のあるアミノ酸を示す)

本アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを下記のように作製し、cDNAライブラリースクリーニング

のプロープとした。N末端アミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

【0013】 GGA AAC AAC GAT GAA TCC AAT ATT TCA TT
C AAA GAG AAA GAT AT (44bp)

＜mRNAの抽出＞P39の親株及びP39(+)亜株からInvitrogene mRNA抽出キット(Invitrogene製)を用いてmRNAを精製した。実際的にはmanufacturer's bookletに拠って再現的に精製できた。各種細胞株、各ヒト臓器からも同様の方法でmRNAを抽出した。

＜cDNAライブラリーの作成＞P39(+)亜株から得たmRNAをRNase(-) reverse transcriptase (GIBCOBRL製)によりcDNAに変換した。さらにDNA polymerase (Toyobo製)により二重鎖DNAとして、これにBstXIリンカーを付加した。リンカー付加DNAをBstXI切断したpCEV4に組み込み、発現法(抗体スクリーニング)、オリゴプローブ法(オリゴヌクレオチドスクリーニング)、いずれでもスクリーニングが可能のcDNAライブラリーを作製した。オリゴプローブ法用にはpCEV4/cDNAをMC1803大腸菌株(大阪大学野島博士より恵与)にエレクトロポレーション法により注入した。発現法用にはpCEV4/cDNAをCOS細胞(ATCCより購入)にトランスフェクトした。トランスフェクトは、エレクトロポレーション法で行った。発現法では陽性クローンを得られなかったため、前者についてのみ以下に述べる。

＜陽性クローンのスクリーニング＞約10⁶個のMC1803コロニーを、すでに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、2個の陽性クローンを得た。スクリーニングはニトロセルロースシートを用いた通常法(Maniatis et al., Molecular cloning, 1989)に拠った。2個の陽性クローンはともに0.9kbで完全長でないことが推定された。

＜cDNAの塩基配列の決定＞2個の陽性クローンをDNAシーケンサー(ABI373A)にかけて全塩基配列を決定した。先にアミノ末端分析で決定したシーケンスを含むが、ATG開始コドン、ポリAシグナル、ポリAテイルを含まないシーケンスが得られた。本シ

ークエンスをもとに3' RACE法、5' RACE法を併用し、図2及び図3に示す最終シーケンスを得た。

【実施例2】 ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティングは、約10μgのRNAを各レーンにアガロース電気泳動し、既報(Maniatis et al., Molecular cloning, 1989)に従ってブロットを行った。アマーシャム社のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、ランダムプライマー法でラベルしたプローブとブロットを60℃、4時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに65℃、0.2×SSCでwashingを行い、オートラジオグラフィーで陽性バンドを検知した。この結果を図4に示す。図4に示すようにP39(+)亜株ではM161Agに対応するRNAが検出されたが、P39(-)亜株では検出されなかった。

【実施例3】 RT-PCR法

Perkin Ermer Cetusのキットを用いてプロトコールに準拠して行った。もとのP39(+)のmRNAから全長の図2及び図3に示したcDNAがRT-PCR法で得られること、P39親株を含んだ他のmRNAから同様のcDNAが得られないことを確認した。

【0014】

【発明の効果】本発明は、新規な膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNAを提供する。M161Agは、ヒト骨髄性白血病細胞のクリアランスを促進するので、本発明は、白血病の治療薬開発等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 M161Agのアミノ酸配列を表す図

【図2】 M161AgをコードするcDNAの塩基配列の前半部分を表す図

【図3】 M161AgをコードするcDNAの塩基配列の後半部分を表す図

【図4】 P39株由来のRNAの電気泳動の結果を示す写真

【図5】 P39株等のmRNAから調製したcDNAの電気泳動の結果を示す写真

【図6】 mixture primerの塩基配列を表す図

【图6】

mixture primer

5' primer

T T T A
 5' -GGNAA AA GA GA -3'
 C C C G

3' primer

5' -AT TC1(N TCNAG AA-3'

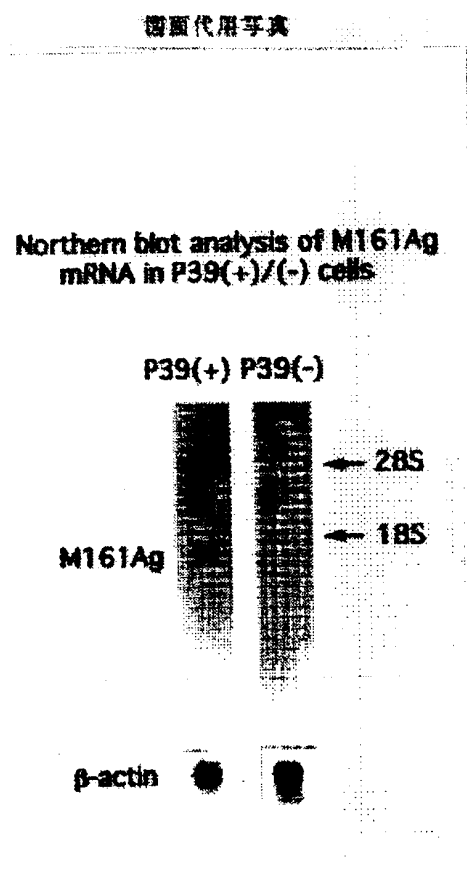
* : セレノシステイン

***：終止

【图3】

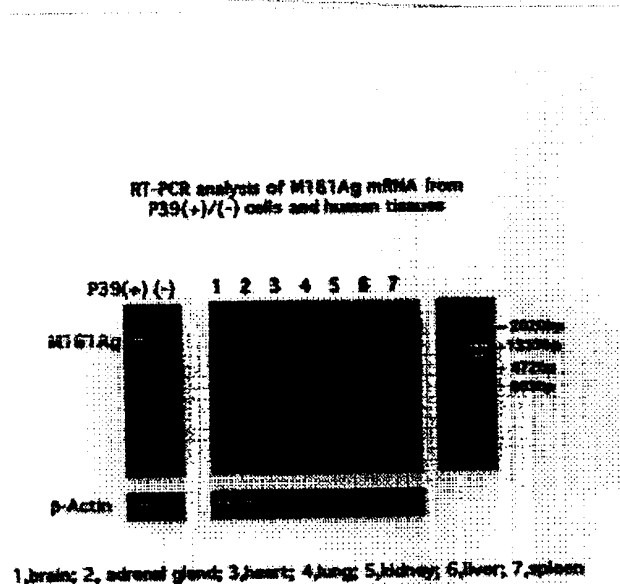
830	860	870	880	890	900
CACTACTTA	AACTACTTA	TTAGACAAA	AACTACTTA	CTACTACTT	CTTACTACT
910	920	930	940	950	960
ACCAAGGAT	CTTCTAGAC	AAAGGACGA	TTCTACTAT	ACTCTTAAA	CACTTAATC
970	980	990	1000	1010	1020
AACTCTTTA	TTAACTTTA	TTAGACTTA	TTCTTAAAA	AGAAAGAAA	TTCTTAACT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ATCTAGTTA	AGCAAAAAA	GGACAAAAA	AAATGACCA	CTTCTAGAT	CTAAAGAAA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AACTAGCTG	TTCTAGAAA	AACTCTTTA	CTAAAGACA	AGAAAGACA	AAATTAATA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AAATTAATA	AGAACTATT	AAATCTTTA	AACTATTAC	AGAACTTTC	CTTAATAATA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TTAAAGACA	CAAACTTTA	AAATCTTTA	AAATTAATA	CAATCTTAT	GAATTAATA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AACTATTAT	TTCTCTATT	AACTAGGAG	CAAACTTTA	AACTAAAAA	AACTCTGAA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AACTCTGAA	TTCTTTATT	TAATTAATA	AAATTAATA	TTCTTTCTA	ATCTTTGAG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AAATTAATA	AACTCTTTA	TTCTCTTTA	TTCTTAATA	AGAAATAATA	GAAATTAATA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CTTCTAATC	TTCTTAAAA	AAATGACTT	GGAAAGACA	AAATCTTAA	AACTCTTAT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TTACTATTT	AACTCTTTA	CACTCTTAA	CTTCTCTCT	GGAACTTAA	TTAACTTTT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
AACTCTTAT	TTAACTTAA	ATCTCTTAA	GAATCTTAT	TTAAATAAA	AAATTAATAA
1630	1640	1650	1660	1670	1680

【図4】



【図5】

図5 代替写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
A 61 K 38/00

識別記号 庁内整理番号

FI
A 61 K 37/02

技術表示箇所

ADV
ZNA

ADV

(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUINGCOUNTRY]

Japanese Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報 (A)

Laid-open (Kokai) patent application number
(A)

(11)【公開番号】

特開平9-157295

(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]

Unexamined-Japanese-Patent 9-157295

(43)【公開日】

平成9年(1997)6月17
日

(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]

June 17th, Heisei 9 (1997)

(54)【発明の名称】

膜タンパク質M161Ag及び
それをコードするcDNA

(54)[TITLE]

Membrane protein M161Ag and cDNA which
codes it

(51)【国際特許分類第6版】

C07K 14/705
C07H 21/04
C12N 15/09 ZNA
C12P 21/02
// A61K 31/70
38/00
ADV
(C12N 15/09 ZNA
C12R 1:91)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(51)[IPC]

C07K14/705
C07H21/04
C12N15/09 ZNA
C12P21/02
//A61K31/70
38/00
ADV
(C12N15/09 ZNA
C12R 1:91)
(C12P21/02
C12R 1:19)

【FI】

C07K 14/705
C07H 21/04 B
C12P 21/02 C
A61K 31/70
C12N 15/00 ZNA A
9282-4B
A61K 37/02
ADV

[FI]

C07K14/705
C07H21/04 B
C12P21/02 C
A61K31/70
C12N15/00 ZNAA9282-4B
A61K37/02
ADV

【審査請求】 未請求

[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED

【請求項の数】 2

[NUMBEROFCLAIMS] Two

【出願形態】 F D

[Application form] FD

【全頁数】 6

[NUMBEROFPAGES] Six

(21) 【出願番号】
特願平 7 - 3 4 4 5 0 4(21)[APPLICATIONNUMBER]
Japanese-Patent-Application-No. 7-344504(22) 【出願日】
平成 7 年 (1 9 9 5) 1 2 月 5
日(22)[DATEOFFILING]
December 5th, Heisei 7 (1995)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】
3 9 6 0 2 0 8 0 0[IDCODE]
396020800【氏名又は名称】
科学技術振興事業団

Japan Science & Technology Corporation

【住所又は居所】
埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8
号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 瀬谷 司

Tsukasa Seya

【住所又は居所】
奈良県奈良市鶴舞西町 2 丁目 1
0, E - 1 0 6

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 松本 美佐子

Misako Matsumoto

【住所又は居所】
奈良県生駒市北大和 2 丁目 2 0

[ADDRESS]

- 7

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】 平木 祐輔 Yusuke Hiraki

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【解決手段】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag、及び前記アミノ酸配列をコードする cDNA。

[SOLUTION]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1, And cDNA which codes the above-mentioned amino acid sequence.

【効果】

新規な膜タンパク質 M161Ag 及びそれをコードする cDNA を提供する。

[EFFECTS]

Novel membrane protein M161Ag and cDNA which codes it are provided.

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項 1】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag。

[CLAIM 1]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

【請求項 2】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードする cDNA。

[CLAIM 2]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or cDNA which codes the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なタンパク質M161Ag及び当該タンパク質をコードするcDNAに関する。

[TECHNICAL FIELD]

This invention relates to novel protein M161Ag and cDNA which codes concerned protein.

【0002】

[0002]

【従来の技術】

M161Agは、ヒト骨髓性白血病細胞株P39(+)に含まれる膜タンパク質であり、第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクローナル抗体の作成はすでになされている (Matsumoto et al., J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995))

[PRIOR ART]

M161Ag is membrane protein contained in the human myelocytic-leukemia cell strain P39 (+).

It has functions, such as activation of a second complement activated route, and the adsorption of a complement C3.

An isolated purification of this protein and preparation of a monoclonal antibody are already made (Matsumoto et al., J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995)).

【0003】

[0003]

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、様々な生理活性を有する膜タンパク質M161AgをコードするcDNAを単離し、該タンパク質のより効率的な利用手段を提供することにある。

[PROBLEM ADDRESSED]

Objective of the invention, It is in isolating cDNA which codes membrane protein M161Ag which has various biological activities, and providing use means more efficient than this protein's.

【0004】

[0004]

【課題を解決するための手段】

本発明者は、M161AgのN末端アミノ酸配列よりプローブ

[SOLUTION OF THE INVENTION]

This inventor determines a probe from N terminal amino acid sequence of M161Ag. It succeeds in isolating a positive clone from

を決定し、これを用いて P 3 9 の cDNA ライブラリーから陽性クローンを単離することに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明は、図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag である。

【0005】

また、本発明は、図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードする cDNA である。以下、本発明を詳細に説明する。本発明の cDNA は、以下のようにしてクローニングすることができる。まず、精製された M161Ag のアミノ酸配列より、プローブを作成する。M161Ag は骨髓性白血病細胞株 P 3 9 の亜株である P 3 9 (－) より、前記した J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995) 記載の方法に従って、単離精製することができる。P 3 9 は、ジャパニーズ・キャンサー・リサーチ・リソース・バンクが保管している。P 3 9 (－) 亜株は、親株の P 3 9 (＋) を低温 (12℃) 下、48 時間培養し、アポトーシス耐性を獲得した株の中から得られる。

【0006】

次に、P 3 9 より、全 mRNA を抽出し、これから cDNA を合成する。合成した cDNA を適当なベクターに挿入し、宿主となる微生物を形質転換し、cDNA ライブラリーを作成す

cDNA library of P39 using this.

This invention was completed.

That is, this invention, the amino acid sequence shown in Figure 1, Or it is protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

[0005]

Moreover, this invention, the amino acid sequence shown in Figure 1, Or it is cDNA which codes the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

Hereafter, this invention is explained in detail.

cDNA of this invention can be cloned as follows.

First, a probe is prepared from the amino acid sequence of purified M161Ag.

M161Ag can be isolate-and-purified from P39 (+) which is the substrain of the myelocytic-leukemia cell strain P39, according to the method of above-mentioned J.Exp.Med. 181, 115-125 (1995) description.

Japanese Cancer-Research resource bank is storing P39.

P39 (+) substrain cultivates P39 (+) of a parent strain for 48 hours under low temperature (12 degrees-Celsius), and is obtained out of the strain which acquired apoptosis resistance.

[0006]

Next, from P39, mRNAs of total are extracted and cDNA is synthesized after this.

Compound cDNA is inserted in a suitable vector and the microorganism used as a host is transformed.

cDNA library is prepared.

Commercially available Invitrogen mRNA

る。P39 (+) より、mRNA を抽出する方法は、市販の Invitrogen mRNA 抽出キットにより行うことができる。cDNA のクローニングは、例えば、pCEV4-ベクターの組み込まれた P39 (+) 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。ベクターとしては、他に pBluescript などを用いることができる。形質転換する微生物としては、例えば、大腸菌株、MC1803 などを用いることができる。スクリーニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行うことができる。

【0007】

クローニングされた cDNA の大きさは、約 1.3 kb であり、その塩基配列は図 2 及び図 3 に示す通りである。これから推定されるアミノ酸配列、即ち、M161Ag のアミノ酸配列は、図 1 に示す通りである。図 1 に示すようにこのタンパク質の 24 個のシグナルペプチドを含む 428 個のアミノ酸からなり、推定分子量は 42 kDa である。

【0008】

本発明の対象となるタンパク質のアミノ酸配列は、図 1 に示す配列に限定されず、これと実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明の技術的範囲に含まれる。ここで、「実質的に同一」とは、図 1 に示すアミノ酸配列の幾つかのアミノ酸

extracting kit can perform the method of extracting mRNA from P39 (+).

A cloning of cDNA can be performed by for example, screening cDNA library of P39 (+) cell where pCEV4 vector was integrated.

As a vector, pBluescript etc. can be used other.

As the microorganism to transform, for example, an Escherichia-coli strain and MC1803, etc. can be used.

A screening can be performed by the colony hybridization method.

[0007]

The sizes of cloned cDNA are about 1.3 kbs.

The base sequence is as being shown in Figure 2 and 3.

The amino acid sequence estimated from now on, that is, the amino acid sequence of M161Ag is as being shown in Figure 1.

As shown in Figure 1, it consists of 428 amino acids containing 24 transit peptides of this protein.

Presumed molecular weight is 42kDas.

[0008]

The amino acid sequence of protein used as the subject of this invention is not limited to the sequence shown in Figure 1. Protein which has the substantially same amino acid sequence as this is also contained in the technical range of this invention.

Here, "it is substantially the same" is the sequence which the change of deletion, substituted, addition, etc. produced about

残基について、欠失、置換、付加等の変化が生じた配列であって、前記配列と同様に第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着など機能を有するような配列をも含むという意味である。同様に本発明のcDNAの塩基配列も、図1に示すアミノ酸配列をコードするものに限定されず、これと実質的に同一な塩基配列を有するDNAも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0009】

M161Agは、細胞のアポトーシスに関連して生合成される膜タンパク質であり、癌細胞、特にヒト骨髓性白血病細胞のクリアランスを促進する。従って、M161Ag及びそれをコードするcDNAは、白血病などの治療薬として利用することができる。

【0010】

【発明の実施の態様】

【0011】

【実施例】

【実施例1】

cDNAのクローニング
 <プローブの作成> M161Agを抗体(M161Ab, 文献J.Exp.Med., 181, 115-125(1995)参照)をプローブとしてP39(一)株 3×10^{10} 個の細胞可

several amino acid residues of the amino acid sequence shown in Figure 1, comprised such that it is the meaning that the sequence which has functions, such as activation of a second complement activated route and the adsorption of a complement C3, as same as the above-mentioned sequence is also contained.

Similarly, the base sequence of cDNA of this invention, It is not limited to that which codes the amino acid sequence shown in Figure 1. DNA which has the substantially same base sequence as this is also contained in the technical range of this invention.

[0009]

M161Ag is membrane protein by which a biosynthesis is carried out in relation to the apoptosis of a cell.

Clearance of a cancer cell, in particular a human myelocytic-leukemia cell is accelerated.

Therefore, M161Ag and cDNA which codes it can be utilized as therapeutic agent, such as leukemia.

[0010]

[The aspect of implementation of invention]

[0011]

[Example]

[Example 1]

A cloning of cDNA

<Preparation of a probe> M161Ag was purified from the cell solubilization fraction of 3*1010 P39 (+) strains, having made the antibody (M161Ab and literature J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995) reference) as the probe (a purification method, above literature).

溶化画分より精製（精製法、上記文献）し、約50 μ gの精製蛋白質を得た。本標品をアミノ末端分析機（ABI ペプチドシーケンサー）にかけ、以下のN末端アミノ酸配列を得た。

[0012]

XGNNDEsNI sFkDIsgY

（大文字は確定したアミノ酸を示し、小文字は可能性のあるアミノ酸を示す）

本アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを上記のように作製し、cDNAライブラリースクリーニングのプローブとした。N末端アミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

[0013]

GGA AAC AAC GAT GAA TCC
AAT ATT TCA TTC AAA GAG
AAA GAT AT (44bp)

<mRNAの抽出> P39の親株及びP39 (+) 亜株からInvitrogene mRNA抽出キット (Invitrogene 製) を用いてmRNAを精製した。実際的にはmanufacturer's booklet に拠って再現的に精製できた。各種細胞株、各ヒト臓器からも同様の方法でmRNAを抽出した。

<cDNAライブラリーの作成> P39 (+) 亜株から得たmRNAをRNase(-) reverse transcriptase (GIBCOBRL 製) によりcDNAに変換した。さらにDNA polymerase (Toyobo 製) により二重鎖DNAとして、これにBstXIリンカーを付

The purification protein of about 50 micro-g was obtained.

This preparation was applied to the amino terminal-analysis machine (ABI peptide sequencer), and the following N terminal amino acid sequences were obtained.

[0012]

XGNNDEsNI sFkDIsgY

(A capital letter showing the settled amino acid. A small letter shows a possible amino acid.)

An oligonucleotide probe is produced as follows from this amino acid sequence.

It made as the probe of cDNA library screening.

The oligonucleotide estimated from N terminal amino acid sequence was synthesized as follows.

[0013]

GGAAACAACGATGAATCCAATATTTTCATTCA
AAGAGAAAGATAT(44bp)

<Extracting of mRNA> mRNA was purified from the parent strain of P39, and P39 (+) substrain using Invitrogen mRNA extracting kit (made by Invitrogene).

In fact, manufacturer's booklet has purified in reproduction.

mRNA was extracted by the method similar also from various kinds of cell strains and each human organ.

<Preparation of cDNA library> mRNA obtained from P39 (+) substrain was transformed into cDNA by RNase(-) reversetranscriptase (made by GIBCOBRL).

Furthermore, BstXI linker was added to this as double chain DNA by DNAPolymerase (made by Toyobo).

Linker addition DNA is integrated in pCEV4 which carried out BstXI cutting. The expression method (antibody screening), the oligo probe

加した。リンカー付加DNAをBstXI切断したpCEV4に組み込み、発現法（抗体スクリーニング）、オリゴプローブ法（オリゴヌクレオチドスクリーニング）、いずれでもスクリーニングが可能なcDNAライブラリーを作製した。オリゴプローブ法用にはpCEV4/cDNAをMC1803大腸菌株（大阪大学野島博士より恵与）にエレクトロポレーション法により注入した。発現法用にはpCEV4/cDNAをCOS細胞（ATCCより購入）にトランスフェクトした。トランスフェクトは、エレクトロポレーション法で行った。発現法では陽性クローンを得られなかったため、前者についてのみ以下に述べる。

陽性クローンのスクリーニング 約 10^6 個のMC1803コロニーを、すでに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、2個の陽性クローンを得た。スクリーニングはニトロセルロースシートを用いた通常法（Maniatis et al., Molecular cloning, 1989）に拠った。2個の陽性クローンはともに0.9 kbで完全長でないことが推定された。

cDNAの塩基配列の決定 2個の陽性クローンをDNAシーケンサー（ABI373A）にかけて全塩基配列を決定した。先にアミノ末端分析で決定したシーケンスを含むが、ATG開始コドン、ポリAシグナル、ポリAテイルを含まないシーケンスが得られた。本シー

method (oligonucleotide screening), and cDNA library in which either has a possible screening were produced.

For oligo probe methods, pCEV4/cDNA was injected by the electroporation method in MC1803 Escherichia-coli strain (it is given from Dr. Nojima, Osaka university).

For expression methods, pCEV4/cDNA was transfected into COS cell (it purchases from ATCC).

The transfection was performed by the electroporation method.

By some expression method, since the positive clone was not obtained, only the former is stated below.

<A screening of a positive clone> It is screened about 106 MC1803 colonies, making the oligonucleotide which already produced as a probe.

Two positive clones were obtained.

The screening was based on the usual method (Maniatis et al., Molecular cloning 1989) using the nitrocellulose sheet.

Both two positive clones are 0.9 kb, and it was estimated that it is not complete length.

<Determination of the base sequence of cDNA> Two positive clones were applied to the DNA sequencer (ABI373A), and base sequences of total were determined.

The sequence previously determined with the amino terminal analysis is contained.

However, the sequence which does not contain ATG initiating codon, a poly A signal, and a poly A tail was obtained.

3'RACE method and 5'RACE method are used together on the basis of this sequence.

The final sequence shown in Figure 2 and 3 was obtained.

クエンズをもとに3' RACE法、5' RACE法を併用し、図2及び図3に示す最終シーケンスを得た。

【実施例2】

ノーザンブロッティング
ノーザンブロッティングは、約10 μ gのRNAを各レーンにアガロース電気泳動し、既報 (Maniatis et al., Molecular cloning, 1989) に従ってブロットを行った。アマーズヤムのハイブリダイゼーションバッファーを用いて、ランダムプライマー法でラベルしたプローブとブロットを60°C、4時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに65°C、0.2×SSCでwashingを行い、オートラジオグラフィで陽性バンドを検知した。この結果を図4に示す。図4に示すようにP39 (-) 亜株ではM161Agに対応するRNAが検出されたが、P39 (-) 亜株では検出されなかった。

【実施例3】

RT-PCR法
Perkin Ermer Cetusのキットを用いてプロトコールに準拠して行った。もとのP39 (-) のmRNAから全長の図2及び図3に示したcDNAがRT-PCR法で得られること、P39親株を含んだ他のmRNAから同様のcDNAが得られないことを確認した。

[Example 2]

Northern blotting

A northern blotting carries out the agarose electrophoresis of the RNA of about 10 micro-g at each lane.

It blotted according to the previous report (Maniatis et al., Molecular cloning 1989).

60 degrees-Celsius and 4 hour hybridization were performed the probe and a blotting which carried out the label by the random primer method, using the hybridization buffer of an Amersham.

Furthermore washing was performed by 65 degrees-Celsius and 0.2×SSC, and the positive band was detected with autoradiography.

This result is shown in a Figure 4.

As shown in a Figure 4, RNA corresponded to M161Ag was detected in P39 (+) substrain.

However, in P39 (-) substrain, it was undetectable.

[Example 3]

RT-PCR process

According to the protocol, it performed using the kit of PerkinErmerCetus.

It confirmed that cDNA shown in Figure 2 and 3 of a full length is obtained from original mRNA of P39 (+) by RT-PCR process, and that similar cDNA was not obtained from other mRNA containing P39 parent strain.

【0014】

[0014]

【発明の効果】

本発明は、新規な膜タンパク質 M161Ag 及びそれをコードする cDNA を提供する。M161Ag は、ヒト骨髓性白血病細胞のクリアランスを促進するので、本発明は、白血病の治療薬開発等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

M161Ag のアミノ酸配列を表す図

【図 2】

M161Ag をコードする cDNA の塩基配列の前半部分を表す図

【図 3】

M161Ag をコードする cDNA の塩基配列の後半部分を表す図

【図 4】

P39 株由来の RNA の電気泳動の結果を示す写真

【図 5】

P39 株等の mRNA から調製した cDNA の電気泳動の結果を示す写真

【図 6】

mixture primer の塩基配列を表す図

【図 1】**[EFFECT OF THE INVENTION]**

This invention provides novel membrane protein M161Ag and cDNA which codes it.

M161Ag accelerates clearance of a human myelocytic-leukemia cell.

Therefore this invention is applicable to therapeutic-agent development of leukemia etc.

[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]**[FIGURE 1]**

The figure showing the amino acid sequence of M161Ag

[FIGURE 2]

The figure showing the first-half part of the base sequence of cDNA which codes M161Ag

[FIGURE 3]

The figure showing the second-half part of the base sequence of cDNA which codes M161Ag

[FIGURE 4]

The photograph in which the result of the electrophoresis of RNA derived from P39 strain is shown

[FIGURE 5]

The photograph in which the result of the electrophoresis of cDNA prepared from mRNA such as P39 strain etc. is shown

[FIGURE 6]

The figure showing the base sequence of mixture primer

[FIGURE 1]

```

1  MKKSKKILLC  11  LSPLAAILPA  21  VAVSQONNDE  31  SNISFKKKDI  41  SKYITTNANG  51  KQVVKNALL
61  KIKPVLITDE  71  GKIDDKSPNQ  81  SAFEALKAIN  91  KQTGHEINNV  101  EPSSNFESAY  111  NSALSAGHKI
121  *VLNGFKHQQ  131  SIKOYIDAGR  141  EELERNQIKI  151  IGIDFIDETE  161  YK*FYSLQFN  171  IKESAFITGY
181  AIAS*LSEQD  191  FSKRVVASFG  201  GGAFPGVITF  211  NEGFAKGILY  221  YNQKHKSSKI  231  YITSPVKIDS
241  GFTAGEKMNT  251  VINNVLSSTP  261  ADVKYNPHVI  271  LSVAGPATFE  281  TVRLANKQGY  291  VIGVDSQGM
301  IQDKDKILTS  311  VLKHKQAVY  321  EITLDDILEK  331  EGGYKPYVVK  341  DKKADKK*SH  351  FGTQKEK*KG
361  VAENHFSNTE  371  EQAKINNKIK  381  EAIKMFRELP  391  EDFVKYINSD  401  KALKDGNKID  411  NVSERLEAH
421
SAINKAAK**

```

* : セレノシステイン

** : 終止

Figure 1

*: Selenocysteine, **: Ending

【図 2】

[FIGURE 2]

```

10  20  30  40  50  60
RAGGAGATTA  TATGAAAGAG  TCAAAAAA  TTTATTAGG  ATTGAGTCT  ATTGATGCTA
70  80  90  100  110  120
TTCTTCCTGC  AGTAGAGCTT  TCTGCGGA  ACRAGGAGA  ATCGACATT  TCATTCAAG
130  140  150  160  170  180
AGAAAGATAT  TACTAAATAT  ACCACACAA  ATGCTAATG  AAACAGATT  GTAAAAAGG
190  200  210  220  230  240
CTGAATTGTT  AAATGTGAA  CGAGTTCTA  TTACAGATG  AGGTAAATX  CATGATAAT
250  260  270  280  290  300
CATTCACCA  ATGAGCTTT  GAGCTTTAA  AAGCTATTA  TACCAACT  GGTATTGAA
310  320  330  340  350  360
TTACATGTT  TGAAGCTAG  TCAACTTTC  AAGTGTCTA  CAACAGTGA  GTTCAGGCG
370  380  390  400  410  420
GACACAAAT  TTGAGTACT  AATGGCTCA  AACACACAA  ATCTATTAA  CATACATTC
430  440  450  460  470  480
ATGCTCACG  AGAGAGACT  GAACAAATC  AATCAAAAT  CATGCTATC  GACTTTGTA
490  500  510  520  530  540
TTGAAACGA  GTACAGTGA  TTTACTCAT  TACATTTAA  TATTAAAGAA  TGTGATTTA
550  560  570  580  590  600
CAACAGGCTA  TGAATGCA  AGTTGATTAA  CTGACACAGA  TGAAGTAAA  AGAGTGTTC
610  620  630  640  650  660
CATGATTGG  TGGAGTGCA  TTCCAGGTG  TTACACATT  TAACTAAGT  TTTGCAAAAG
670  680  690  700  710  720
GTATCTATA  CTACAGCAA  AATCATAAAT  CAAGTAAAT  TTACACACA  TCACTGTTA
730  740  750  760  770  780
AATGAGCTC  AGGTCTACT  GTGCTGAAA  AATGACAA  TGTATTAAT  AATGTTTAT
790  800  810  820  830  840
CTTCAAGAC  AGCTGATCT  AAACACAGC  CACAGTCTT  CTTATCTTT  GTGGAGCTG

```

Figure 2

Initiating codon

[3]

[FIGURE 3]

850	860	870	880	890	900
GTACATTTGA	AACTGTGACA	TTAGGAGACA	AGGCTGACA	TGUAATGGT	GTGACTGAC
910	920	930	940	950	960
ACCAAGGCAAT	GATTCAGAC	AAAGAGAGAA	TTCTACATC	ACTCTTAAA	CACATTAAG
970	980	990	1000	1010	1020
AACTGTGTTA	TGAACATTA	TTAGATCTTA	TTCTTGAAA	AGGAGAGGA	TATAAAGCA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ATGTAGTTAA	AGACAAAAA	GGAGACAAA	TATGAAGCA	CTTGGAACT	CAAAAAGAA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AATGAATGCA	TGTGGGAAA	AACCACTTC	CAAAACAAA	AGACAGCA	AAATTAATA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ACAAATTTAA	ACAGCAATT	AAATGTTTA	AACAATTAC	AGAAGATTG	GTAAATATA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TTAAATGCA	CAAGCTTTA	AAAGCTGTA	ATAAAATTA	CAATGTGAT	GAAGATTAG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAAGCAATAT	TTCTATGAT	AAAGAGGAG	CAAAATGAT	AAACAAAAA	ATGCTGGAAA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATATGAGCA	CTTTGATTC	TAATATGAA	AAAGTAAAT	TTTCTGTTA	ATTCTTGAG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AAATTAGATA	AAAGCTTTT	TCGCTTTTG	TTCTGAATA	AGATTAATA	GAGAAAGAG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GTGTAAAGC	TGCTTACGA	AAAGAGATT	GGAAACACA	AAAGTTAAG	ACCAATTTAT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TTAACTACTT	ATGATTTGA	GATGATAGG	GTCATGGGT	GTACATGGA	TGAATATTG
1570	1580	1590	1600	1610	1620
ATTCTGATTT	TAATAGGAG	ATTGATACA	GAATGACTT	TAATAAAAA	AAAAAAGAA
1630	1640	1650	1660	1670	1680

Figure 3

Ending codon

[6]

[FIGURE 6]

mixture primer

5' primer

T T T A
 5'-CGNAA AA GA CA-3'
 C C C G

3' primer

A T A
 5'-AT TCTNN TCNAG AA-3'
 C C G

Figure 6 (top to bottom)

5' side primer, 3' side primer

【図 4】

[FIGURE 4]

図面代用写真

Northern blot analysis of M161Ag
mRNA in P39(+)/(-) cells

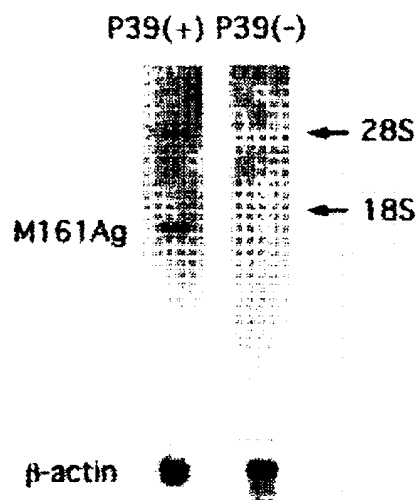
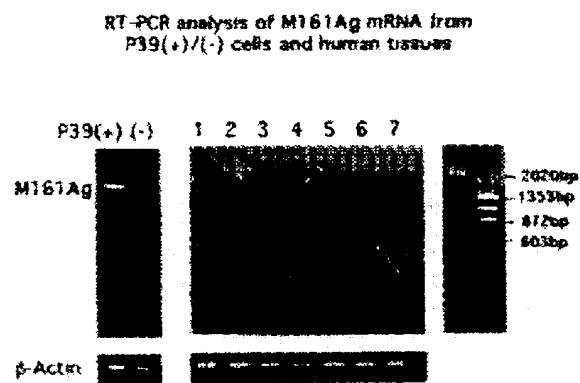


Figure 4: Replaced by photo

【図 5】

[FIGURE 5]

RT-PCR analysis of M161Ag mRNA from P39(+)/(-) cells and human tissues



1, brain; 2, adrenal gland; 3, heart; 4, lung; 5, kidney; 6, liver; 7, spleen

Figure 5: Replaced by photo